Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H. Sies

Messung der H_2O_2-Produktion in der isoliert perfundierten Leber der Ratte und ihre Anwendung bei der peroxisomalen β-Oxidation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
Medizin an der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Fährenkemper
aus
Garrel

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0031

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H. Sies

"Messung der H_2O_2-Produktion in der isoliert perfundierten Leber der Ratte und ihre Anwendung bei der peroxisomalen β-Oxidation"

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
Medizin an der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Fährenkemper
aus
Garrel
1982

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. H. Th. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. med. H. Sies

Korreferent
gez.: Prof. Dr. med. R. Teschke

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung
1. Wasserstoffsuperoxid als Zellmetabolit
2. H_2O_2-Bildung in Peroxisomen
3. Die peroxisomale β-Oxidation
4. Metabolisierung des H_2O_2 im Peroxisom
5. Erläuterung der Meßmethoden anhand des H_2O_2-Stoffwechsels

II. Material und Methodik
1. Hämoglobinfreie Leberperfusion im offenen System
2. Substrate
a. Caprylsäure (Oktansäure)
b. Caprinsäure (Dekansäure)
c. Palmitinsäure (Hexadekansäure)
d. Ölsäure
e. Erucasäure
f. Linolsäure
g. Harnsäure
3. Meßmethodik
4. Metabolitanalysen
5. Material (Biochem. Substrate, Enzyme)
6. Geräte

III. Ergebnisse
1. Messung der H_2O_2-Produktion auf organspektrophotometrischem Wege
2. Quantitative Bestimmung der H_2O_2-Produktion aus Fettsäuren über den peroxidatischen Umsatz von $^{14}CH_3OH$ zu $^{14}CO_2$
3. H_2O_2-Produktion verschiedener Fettsäuren
4. Spezifität der Messungen
5. Bezafibrateffekte auf die Rattenleber
6. Fettsäureaufnahme der perfundierten Rattenleber
7. Ketonkörperproduktion bei Infusion von Fettsäuren

IV. Diskussion
1. Messung der H_2O_2-Produktion

2. H_2O_2-Bildung aus freien Fettsäuren in der intakt perfundierten Rattenleber und in isolierten Peroxisomen im Vergleich

V. Zusammenfassung der Ergebnisse

VI. Literaturhinweise

VII. Anhang

I. Einleitung

1. Wasserstoffsuperoxid als Zellmetabolit

Wasserstoffsuperoxid ist ein physiologisches Produkt des Zellstoffwechsels, welches unter entsprechenden Bedingungen in allen Zellkompartimenten gebildet wird (1, 2). Mitochondrien, deren Elektronentransportkette durch Antimycin A blockiert wurde (3), produzieren H_2O_2 ebenso wie das endoplasmatische Retikulum bei Anwesenheit von NADH oder NADPH (2). Selbst in Zellkernen kann die Entstehung von H_2O_2 nachgewiesen werden (2, 4).

2. H_2O_2-Bildung in Peroxisomen

Peroxisomen enthalten eine Anzahl von H_2O_2-erzeugenden Enzymen wie Uratoxidase bei Nichtprimaten (2, 5), Glykolatoxidase und D-Aminosäureoxidase.
Ein Zusammenhang zwischen peroxisomaler H_2O_2-Bildung und Oxidation von Fettsäuren wurde erstmals 1969 von Cooper und Beevers nachgewiesen, die an Glyoxisomen (Peroxisomenäquivalent bei Pflanzen) des Endosperms von Rizinussamen eine stöchiometrische Bildung von Wasserstoffperoxid bei der Fettsäureoxidation beobachteten. Lazarow und de Duve (7) zeigten 1976 die peroxisomale Fettsäureoxidation an isolierten Peroxisomen aus Rattenleberzellen, Kawamoto et al. folgten 1978 mit dem Nachweis dieses Stoffwechselweges an Hefezellen (8). Kramar et al. (9) sowie Murphy et al. (10) zeigten ihn am braunen Fettgewebe der Ratte bzw. der Maus und Bronfman et al. (11) schließlich an der menschlichen Leber.

3. Die peroxisomale β-Oxidation

Die peroxisomale Fettsäureoxidation erzeugt - wie die mitochondriale - Acetyl-CoA durch β-Oxidation von eingeschleusten Acyl-CoA-Verbindungen. Im Gegensatz zum Mitochondrium umfaßt jedoch die erste Dehydrogenierung die Reduktion von O_2 zu H_2O_2 (12).
Dieser Schritt wird durch das Enzym "Acyl-CoA-Oxidase" katalysiert, wobei der Wasserstoff zunächst auf FAD als Koenzym übertragen wird. Dieses Enzym konnte von Osumi et al. (13) erstmals aus Rattenleberperoxisomen isoliert werden.

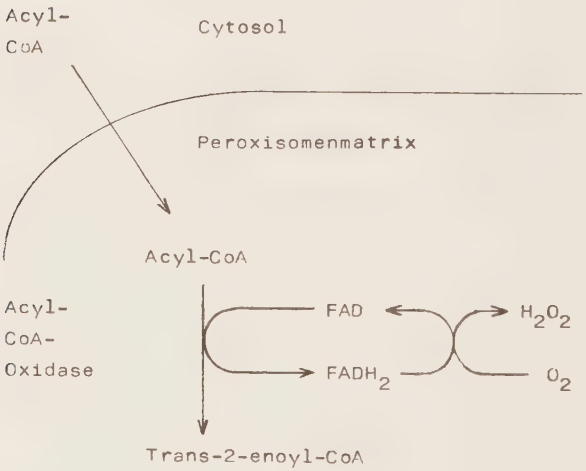

Abb. 1: Entstehung von H_2O_2 aus aktivierten Fettsäuren; der weitere Abbau des Trans-2-enoyl-CoA erfolgt wie im Mitochondrium. Nach (6) und (13).

4. Metabolisierung des H_2O_2 im Peroxisom

Das durch die Acyl-CoA-Oxidase, jedoch auch durch andere peroxisomale Oxidasen gebildete H_2O_2, wird durch Katalase, das Markerenzym der Peroxisomen (14), umgesetzt. Die zentrale Rolle spielt dabei der 1947 von Chance entdeckte "Katalase-Komplex I" aus Katalase und H_2O_2. Abbildung 2 zeigt einerseits extraperoxisomale H_2O_2-Lieferanten, andererseits die wichtigsten H_2O_2-bildenden Substrate wie Harnsäure, D-Aminosäuren und Fettsäuren sowie die Umsetzung des anfallenden Wasserstoffperoxids über den Katalase-Komplex I.
Nach Bildung des Katalase-Komplexes I kann H_2O_2 auf zwei miteinander konkurrierenden Reaktionswegen abgebaut werden; bei der katalatischen Reaktion (5, 16) entsteht wieder freie Katalase nach Bildung von H_2O und O_2. Bei der peroxidatischen Reaktion erfolgt unter Anwesenheit eines geeigneten Wasserstoffdonators (z. B. Methanol) die Bildung von H_2O bei gleichzeitiger Oxidation des Donators.

5. Erläuterung der Meßmethoden anhand des H_2O_2-Stoffwechsels

Bietet man als Wasserstoffdonator ^{14}C-markiertes Methanol für den peroxidatischen Reaktionsweg an, so kann man durch Messung des bei der Oxidation entstehenden $^{14}CO_2$ nach Kalibrierung mit Harnsäure [1:1-Stöchiometrie, (25)] die H_2O_2-Produktion der perfundierten Leber ermitteln.
In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode ebenso wie die von Sies, Chance et al. für die Messung des Katalase-Komplexes I entwickelte Organspektrophotometrie (19, 20) verwendet.

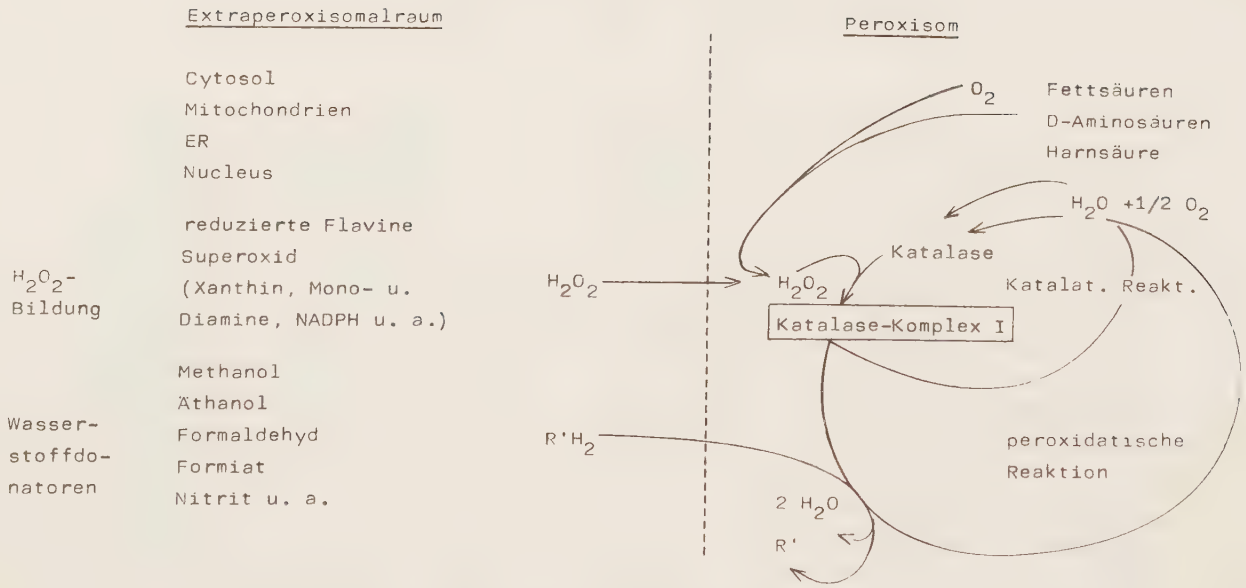

Abb. 2: Rolle der H_2O_2-erzeugenden Systeme und des Katalase-Komplexes I im H_2O_2-Stoffwechsels; modifiziert nach (5).

II. Material und Methodik

1. Hämoglobinfreie Leberperfusion im offenen System

Lebern männlicher Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 110-180 g wurden nach (21, 22) ohne Rezirkulation des Perfusats bei 37,0 °C perfundiert. Als Perfusionsmedium diente der 1932 von Krebs und Henseleit beschriebene Bikarbonatpuffer (23), der mit einem O_2/CO_2-Gemisch (19:1, v:v) über einen Schlauchoxigenator äquilibriert wurde. Wenn nicht anders angegeben, enthielt der Puffer, jeweils als Natriumsalz, L-Laktat (0,3 mM), L-Pyruvat (0,3 mM), D,L-β-Hydroxybutyrat (0,5 mM) und L-Acetoacetat (0,3 mM), bei den Experimenten mit radioaktiv markiertem Methanol zusätzlich L-Methionin (0,2 mM). Der Perfusionsfluß wurde mit 3,5 bis 5 ml/min/g Leber im einzelnen Experiment jeweils konstant gehalten.

2. Substrate

Die zu untersuchenden Substrate wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und mit Präzisionspumpen in das durch die Vena portae in die Leber einströmende Perfusionsmedium gegeben. Die verwendeten Fettsäurestammlösungen wurden wie folgt hergestellt:

a. Caprylsäure (Oktanoat), 15 mM

108,2 mg Caprylsäure wurden mit 0,8 ml 1 M NaOH versetzt und gelöst; anschließend Zugabe von 45 ml bidest. Wasser; die Lösung wurde mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 50,0 ml aufgefüllt.

b. Caprinsäure (Dekanoat), 15 mM

129 mg Caprinsäure wurden mit 0,8 ml 1 M NaOH versetzt und gelöst; anschließend Zugabe von 45 ml bidest. Wasser; die Lösung wurde mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 50,0 ml aufgefüllt.

c. Palmitinsäure, 15 mM

38,4 mg Palmitinsäure wurden mit 4 ml bidest. Wasser und 0,3 ml 1M NaOH im Branson-Sonifier solange durch Ultraschalleinwirkung erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete; diese wurde dann unter ständiger Beschallung mit einer Rinderserumalbuminlösung (5 g RSA in 10 ml bidest. Wasser) auf 9 ml aufgefüllt und mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt und danach mit RSA-Lösung auf ein Endvolumen von 10,0 ml gebracht.

d. Ölsäure, 15 mM

42,3 mg Ölsäure wurden mit 4 ml bidest. Wasser und 0,2 ml 1 M NaOH im Branson-Sonifier solange durch Ultraschalleinwirkung erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete; unter ständiger Beschallung wurde diese dann mit einer Rinderserumalbuminlösung (2 g RSA in 10 ml bidest. Wasser) auf 9 ml aufgefüllt, mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt und danach mit RSA-Lösung auf ein Endvolumen von 10,0 ml aufgefüllt.

e. Erucasäure, 15 mM

51 mg Erucasäure wurden mit 2 ml bidest Wasser und 0,18 ml 1 M NaOH im Branson-Sonifier solange durch Ultraschalleinwirkung erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete; unter ständiger Beschallung wurde diese dann mit einer Rinderserumalbuminlösung (siehe bei Ölsäure) auf 9 ml

aufgefüllt, mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt und mit RSA-Lösung auf ein Endvolumen von 10,0 ml aufgefüllt.

f. Linolsäure, 15 mM

42,1 mg Linolsäure wurden mit 4 ml bidest. Wasser und 0,2 ml 1 M NaOH im Branson-Sonifier solange erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete; das weitere Vorgehen war wie bei Ölsäure.

g. Harnsäure, 15 mM

127 mg Harnsäure wurden in 45 ml bidest. Wasser suspendiert und durch Zugabe von 2 ml 1 M NaOH gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch vorsichtiges Zugeben von 1 M HCl auf einen pH- Wert von 7,6 eingestellt. Danach wurde sie mit bidest. Wasser auf 50,0 ml aufgefüllt und durch ein 5-Mikrometer-Millipore -Filter filtriert.

Andere spezielle Infusionen (Hemmstoffe, Hormone u.a.) und deren Ansatz werden bei der Besprechung der Ergebnisse spezieller Versuche beschrieben, da kein routinemäßiger Ansatz dieser Substanzen erfolgte.

3. Meßmethodik

Auf die Meßmethodik wurde, soweit sie sich aus dem H_2O_2-Stoffwechsel ableiten läßt, bereits eingegangen. Im folgenden Teil sollen die beiden angewendeten Methoden näher beschrieben werden.
Die H_2O_2-Produktion wurde quantitativ a) durch organspektrophotometrische Messung des Katalase-Komplexes I nach (5, 19, 20, 21, 24) und b) durch Messung des Umsatzes von $^{14}CH_3OH$ zu $^{14}CO_2$ bei der peroxidatischen Reaktion der Katalase im System der gekoppelten Oxidationen nach Keilin und Hartree (18) bestimmt.
Bei a) wurden entweder das in (19, 24, 26, 30) beschriebene oder ein Zweiwellenlängenspektralphotometer (Sigma ZWS 11, Biochem. Co., München), welches speziell für diesen Zweck umgerüstet wurde, ohne entdeckbare Unterschiede hinsichtlich der Ergebnisse verwendet.
Licht der Wellenlängen 660 nm und 640 nm wurde nach Durchstrahlung eines ca. 3 mm dicken Leberläppchens einem Photomultiplier zugeleitet; gemessen wurde die Absorptionsdifferenz Δ A (660-640) nm.
Die Details der Kalibrierung werden bei den Ergebnissen erläutert.
Bei b) wurde die H_2O_2-Produktion durch Messung der Oxidationsgeschwindigkeit von $^{14}CH_3OH$ zu $^{14}CO_2$ und Kalibrierung des Umsatzes mit der peroxisomalen Harnsäureoxidation gemessen (31).
Nach der ca. 10-15 min dauernden Leberpräparation wurde $^{14}CH_3OH$ (0,3 mCi/mol) in das Perfusionsmedium gegeben; die Konzentration betrug, sofern nicht anders angegeben, 1 mM. Ca. 15-20 min später stellte sich ohne Zugabe von Fettsäuren eine konstante Geschwindigkeit bei der Bildung von $^{14}CO_2$ aus dem markierten Methanol ein. Das aus der Leber fließende Perfusat wurde nach dieser Zeit in einminütigen Abständen in Erlenmeyerkolben zur $^{14}CO_2$-Messung gesammelt. Die Zugabe von Fettsäure- und Harnsäure-

infusionen erfolgte normalerweise über 15 min; 5 min nach Infusionsbeginn wurden dann 10 Perfusatproben in der beschriebenen Weise gesammelt. Nach Beendigung jeder Infusion wurde für wenigstens 5 min keine Probe gesammelt, um dem Meßsystem genügend Zeit für den Rückgang auf den Ausgangszustand zu geben. Bei langkettigen Fettsäuren wurde diese Zeit bis zu 20 min verlängert. Nach dieser Zeit wurden erst wieder 10 min lang Leerproben gesammelt, bevor mit einer neuen Infusion begonnen wurde.

Jede Perfusatprobe im Erlenmeyerkolben wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, der einen Haken zum Einhängen von Meßgefäßen für den Flüssigszintillationszähler (Kontron Analytik GmbH, Eching bei München) und einen dünnen Teflonschlauch enthielt. Anschließend wurde das Perfusat über den Teflonschlauch mit 25 %iger Schwefelsäure oder 3 M Zitronensäure angesäuert, der Teflonschlauch verschlossen und unter zweitägigem Schütteln auf einer Schüttelmaschine das im Perfusat enthaltene $^{14}CO_2$ ausgetrieben. Als Absorptionsmedium für das ausgetriebene $^{14}CO_2$ diente Phenyläthylamin, welches sich in dem eingehängten Meßgefäß befand. Die $^{14}CO_2$-Messung erfolgte nach Zugabe von 5 ml Szintillationflüssigkeit (Zinsser) bei einer Zählzeit von 2 bis 5 min je Probe.

Die $^{14}CO_2$-Bildungsgeschwindigkeit wurde in H_2O_2-Bildungsgeschwindigkeit umgerechnet, wobei zur Kalibrierung des Meßsystems die H_2O_2- Produktion bei Harnsäureinfusion benutzt wurde. Oshino et al. (25) wiesen für die Uratoxidation eine 1:1 Stöchiometrie zwischen umgesetzten Harnsäuremolekülen und produziertem H_2O_2 nach. Der Harnsäureumsatz und damit die H_2O_2-Produktion wurde durch Messung der Konzentrationsdifferenz im ein- und ausfließenden Perfusat im optischen Test nach (27) gemessen (s. u.) und als H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit berechnet.

4. Metabolitanalysen

Die Metabolitanalysen waren bis auf die Fettsäurebestimmung enzymatische Tests - in Anlehnung an die in (27) angegebenen. Sie wurden bei Zimmertemperatur halbautomatisch durchgeführt. Die Extinktion lieferte vor dem Start der Reaktion ein Referenzgemisch gleicher Zusammensetzung wie das Testgemisch, jedoch ohne die zu testende Substanz. Da bei den meist kurzdauernden Perfusionen keine störenden Enzymaktivitäten im Perfusat zu finden waren, erfolgte keine Enteiweißung.
An Metabolitanalysen wurde durchgeführt:

a. Pyruvat — 0,5 ml 0,1 M TRA pH 7,6; 0,2 mM NADH; 2 Einheiten LDH (Schweinemuskel); 0,1 ml Perfusat

b. Laktat — 0,5 ml 0,5 M Glycin, 0,4 mM Hydrazinhydrat pH 9,1; 1,5 mM NAD; 3 Einheiten LDH (Schweinemuskel) 0,1 ml Perfusat

c. Acetoacetat — 0,5 ml 0,1 M TRA pH 7,6; 0,2 mM NADH 0,005 Einheiten HBDH (Rhodopseudomonas spheroides) 0,1 ml Perfusat

d. β-Hydroxybutyrat — 0,5 ml 0,1 mM Tris, 0,4 M Hydrazinhydrat pH 8,5; 1,5 mM NAD 0,005 Einheiten HBDH (Rhodopseudomonas spheroides) 0,1 ml Perfusat

e. Urat — 0,3 ml Borat-Puffer, 0,005 ml Uricase (Schweineleber) 0,2 ml Perfusat direkte Messung bei 293 nm

f. Bestimmung unveresterter Fettsäuren im Perfusat

Der Testansatz zur Konzentrationsbestimmung freier Fettsäuren im Serum wurde von Duncombe (28) beschrieben und mußte an die veränderten Verhältnisse bei der Leberperfusion angepaßt werden. Da es sich beim Perfusat um ein wäßriges Medium handelte, wurde auf eine Enteiweißung verzichtet. Die Spuren von RSA bei Perfusionen mit längerkettigen Fettsäuren wirkten sich nicht störend aus.
Die sehr geringe Fettsäurekonzentration erforderte ein im Vergleich zur Originalvorschrift wesentlich höheres Probevolumen; dennoch konnte durch Verringerung des Gesamtvolumens der Test in 1,3 ml fassenden Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt werden, was die Handhabung sehr erleichterte.
Im einzelnen wurde der Test wie folgt durchgeführt:

1. Extraktionsgemisch nach (29):
   Chloroform/n-Heptan/Methanol = 1:1:1 (v:v:v)
2. Kupfer-Reagens:
   Triäthanolamin-Puffer 0,45 M, pH 7,8
   Kupfernitrat 0,27 M
3. Farbreagens:
   25 mg Diäthyldithiocarbaminat wurden in 25 ml Isobutanol gelöst; das Farbreagens mußte jedes Mal kurz vor Testbeginn neu angesetzt werden.
4. Standardkonzentrationsreihe:
   Von der Fettsäurestammlösung, die zur jeweiligen Perfusion benutzt wurde, wurde durch Verdünnung mit Perfusionsmedium eine Standardreihe mit den Konzentrationen 0,025 mM, 0,05 mM, 0,075 mM, 0,1 mM und 0,15 mM hergestellt. Als Leerwert wurde Perfusionsmedium genommen.
5. Testansatz:
   Zur Testdurchführung wurden 0,4 ml Probe bzw. Standard mit 0,8 ml Extraktionsgemisch versetzt,

dann 0,1 ml Kupferreagens zugegeben und 5 min auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Dabei war es wichtig, daß die organische und die wäßrige Phase intensiven Kontakt miteinander bekamen, um die Fettsäuren aus dem Perfusat vollständig zu extrahieren.
Anschließend wurden Probe bzw. Standard mit einer Eppendorf-Zentrifuge scharf für 2 min zentrifugiert. Der blaue Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe, an die eine feine Pipettenspitze angeschlossen war, vorsichtig abgesaugt.
Aus der verbleibenden organischen Phase wurden je 0,5 ml in ein neues, bereits mit 0,2 ml Farbreagens gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der sich bildende Farbkomplex wurde bei 436 nm im Eppendorf-Photometer mit angeschlossenem Drucker gemessen. Als Leerwert diente Extraktionsgemisch.
Da es sich bei der Methode um ein nichtenzymatisches Verfahren handelte, wurden die Standards zweifach, die Proben dreifach angesetzt.

6. Auswertung:
Die Fettsäurekonzentrationen wurden nach Berechnung der Regressionsgeraden der Extinktionen der Standardkonzentrationen direkt abgelesen. Zusätzlich wurden Mittelwert und Standardabweichung aus den Dreifachansätzen der Proben berechnet.

5. Material

Biochemische Substrate und Enzyme stammten von Boehringer (Mannheim, Deutschland), Chemikalien von Merck (Darmstadt, Deutschland), mit Ausnahme von L-Laktat (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Rinderserumalbumin (RSA, Cohn-Fraktion V, defatted) und langkettigen Fettsäuren (beides von Serva, Heidelberg, Deutschland) und ^{14}C-Methanol (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland). Bezafibrat wurde freundlicherweise von Boehringer (Mannheim) zur Verfügung gestellt.

6. Gerate

Die folgende Liste gibt eine Übersicht über die zur Durchführung der Messung überwiegend benutzten Geräte:

Organspektrophotometrie	Sigma ZWS 11, Biochem. Co. München
Metabolitanalysen	Eppendorf-Photometer 6118 mit dem Probentisch 5122 und Drucker, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg
$^{14}CO_2$-Messung	Kontron-Flüssigszintillationszähler, Kontron-Analytik GmbH, Eching bei München

III. Ergebnisse

1. Messung der H_2O_2-Bildungsgeschwindigkeit auf organspektrophotometrischem Wege

Bei der bereits zuvor kurz besprochenen Organspektrophotometrie gibt es zwei verschiedene Methoden zur Messung der H_2O_2-Bildung.
Einerseits kann der Effekt einer Fettsäure auf den Katalase-Komplex I durch den der Harnsäure kalibriert und somit quantifiziert werden.
Diese Art der H_2O_2-Messung verdeutlicht Abb. 3.
Bei der anderen organspektrophotometrischen Methode wird eine Titration mit einem Wasserstoffdonator mit und und ohne Infusion einer Fettsäure durchgeführt.
Wie Abb. 3 zeigt, bewirkt die Infusion von Harnsäure in drei verschiedenen Geschwindigkeiten eine schrittweise Zunahme des Katalase-Komplexes I. Die Zufuhr von 154, 77 und 39 nmol pro Minute pro g Leber Frischgewicht ist dabei entsprechend der von Sies (32) gemessenen Uratoxidationsrate und der 1:1 Stöchiometrie zwischen oxidierter Harnsäure und erzeugtem H_2O_2 der Menge an gebildetem H_2O_2 gleichzusetzen.
So kann aus der Registrierung direkt abgelesen werden, daß die Zufuhr von 411 nmol/min/g Leber Frischgewicht Caprinsäure (10:0) die Bildung von etwa 80 nmol/min/g Leber Frischgewicht H_2O_2 bewirkt.
Die zweite organspektrophotometrische Meßmethode verdeutlichen Abb. 4, Abb. 5 und Tab. 1.
Während der Zeit von 40-56 min in Abb. 4 wird eine Methanol-Titration durchgeführt, ohne daß eine Fettsäure infundiert wird, um die endogene H_2O_2-Bildung zu messen. Danach wird die Titra-

tion in Gegenwart einer Dekanoatinfusion wiederholt. Zuletzt erfolgt eine erneute Titration unter endogenen Bedingungen. Die Berechnung der H_2O_2-Bildung wird möglich durch Ermittlung der halbmaximalen Methanolkonzentration $a_{1/2}$ aus einem doppeltlogarithmischen Diagramm, in dem die fraktionierte Sättigung des Katalase-Komplexes I gegen die Methanolkonzentration aufgetragen ist.
Wie aus Abb. 5 ersichtlich, ist $a_{1/2}$ für endogene Bedingungen 0,12 mM, in Übereinstimmung mit (24), wogegen $a_{1/2}$ bei der Dekanoatinfusion 0,24 mM beträgt. Die H_2O_2-Bildung berechnet sich aus diesen Daten auf 75 nmol/min/g Leber Frischgewicht (siehe Tab. 1); dieser Wert stimmt gut mit dem bei der anderen Methode erhaltenen überein.

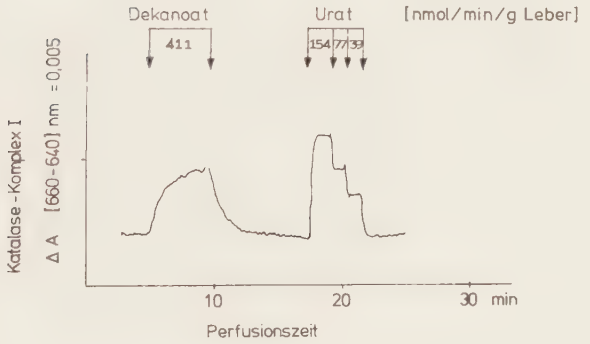

Abb. 3: H_2O_2-Produktion der perfundierten Rattenleber bei Infusion von Dekanoat (411 nmol/ min/ g Leber Frischgewicht).
Es erfolgte eine organspektrophotometrische Messung bei Kalibrierung des Meßsystems mit Harnsäure. Die H_2O_2-Produktion läßt sich direkt ablesen (ca. 80 nmol/min/ g Leber).

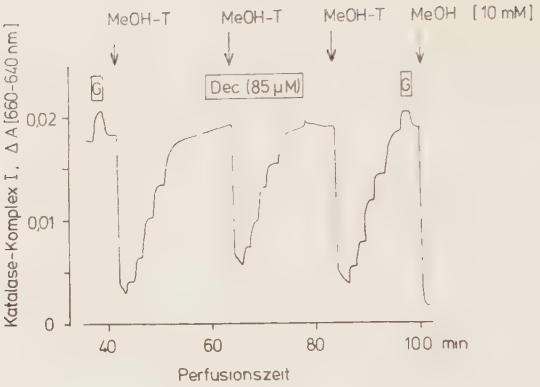

Abb. 4: "Methanoltitrationen" (MeOH) des Katalase-Komplexes I der perfundierten Rattenleber mit und ohne Infusion von Dekanoat; der Titrationsbeginn wird jeweils durch Pfeile gekennzeichnet. Die Methanolkonzentrationen betrugen bei den Titrationen jeweils von links nach rechts 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 und 0.05 mM. Zur Bestimmung der Maximalsättigung der Katalase mit H_2O_2 wurde 1 mM Glykolat (G) ohne Methanolzugabe infundiert, zur Bestimmung des ungesättigten Zustandes der Katalase Methanol in einer Konzentration von 10 mM. Die Kästchenbreite zeigt die jeweilige Infusionsdauer bei Glykolat und Dekanoat. Man beachte die Stabilität der optischen Aufzeichnung während der Versuchsdauer von 60 min.

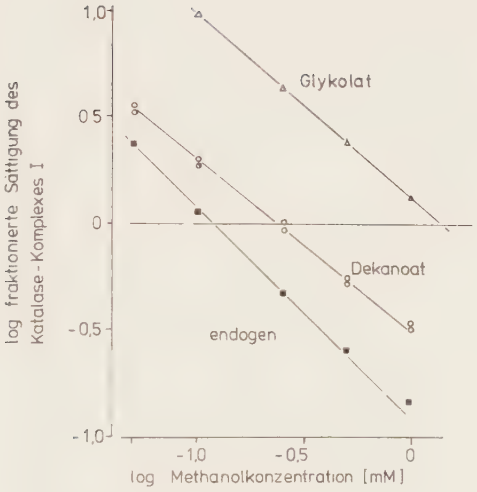

Abb. 5: Dieses Diagramm zeigt die Ergebnisse aus Abb. 4 und eine zusätzliche Titration bei Glykolatzufuhr (0,42 mM). Weitere Details siehe S. 15 und Tab. 1 (S. 18). Der nicht ganz parallele Verlauf der Geraden bei Dekanoat ist wahrscheinlich auf eine geringe Verschiebung der Registrierung während des Versuchs zurückzuführen (siehe auch Abb. 8).

Tabelle 1:

H_2O_2-Bildung der perfundierten Rattenleber, gemessen durch Organspektrophotometrie des Katalase-Komplexes I

Die H_2O_2-Bildungsgeschwindigkeit wurde über die Gleichung

$$dx_n/dt \cdot 1/e = 31{,}5\ a_{1/2} \qquad (25)$$

berechnet.

Es bedeuten:

$a_{1/2}$	Methanolkonzentration, die für die halbmaximale Sättigung des Katalase-Komplexes I erforderlich ist (mM)
e	Katalasegehalt der Rattenleber, 20 nmol Katalase/g Leber Feuchtgewicht
dx_n/dt	H_2O_2-Bildungsgeschwindigkeit

Die folgenden Daten beziehen sich auf Abb. 4 und 5.

Infusion	$a_{1/2}$ (mM)	Wechselzahl $dx_n/dt \cdot 1/e$ (min^{-1})	H_2O_2-Bildung dx_n/dt (nmol/min/ g Leber)
keine (endogen)	0,12	3,8	76
Dekanoat	0,24	7,6	151
Glykolat	1,40	44,1	882

2. Quantitative Bestimmung der H_2O_2-Produktion aus Fettsäuren über den peroxidatischen Umsatz von $^{14}CH_3OH$ zu $^{14}CO_2$

Die im Rattenleberperoxisom miteinander konkurrierenden Reaktionen des H_2O_2-Abbaues können durch Zufuhr eines Wasserstoffdonators in Richtung auf die peroxidatische Reaktion der Katalase beeinflußt werden (Oshino et al., 33).
Abb. 6 a zeigt die Messung des peroxidatisch umgesetzten H_2O_2 bei konstanter H_2O_2-Produktion aus Harnsäure und steigender Methanolkonzentration im Perfusat.
In Übereinstimmung mit dem in vitro-System und mit Versuchen an isolierten Fettzellen, an denen die $^{14}CO_2$-Bildung aus ^{14}C-Ameisensäure gemessen wurde, verdeutlicht Abb. 6 a, daß der Anteil "F" an peroxidatisch umgesetztem H_2O_2 mit steigender Methanolkonzentration im Perfusat zunimmt (33, 34).
Wegen der nur geringen H_2O_2-Bildungsgeschwindigkeit nimmt die Streuung der Meßergebnisse bei der $^{14}CO_2$-Messung stark zu, wenn die Methanolkonzentration erhöht wird. Für die Messungen wurde deshalb eine Methanolkonzentration von 1 mM gewählt, die sich nach mehreren Vorversuchen als optimal erwies.
Abb. 6 b zeigt die H_2O_2-Produktion bei einer Methanolkonzentration von 1 mM in Abhängigkeit von der Harnsäureaufnahme; es zeigt sich, daß "F" im Bereich von 0-300 nmol/min/g Leber Frischgewicht nicht von der Wechselzahl der Katalase abhängig ist; die Extra-CO_2-Bildung ist weitestgehend linear im Verhältnis zur gemessenen Harnsäureaufnahme, so daß auch bei der Berechnung der H_2O_2-Produktion aus Fettsäuren von linearen Beziehungen ausgegangen werden kann.
Abb. 6 c zeigt die Ergebnisse der $^{14}CO_2$-Messung eines Versuches mit Dekanoat. Bei Infusion der

Fettsäure steigt die Zahl der radioaktiven Zerfälle von 944 auf 1051 CPM und kehrt 5 min nach Ende der Infusion auf 960 CPM zurück. Die folgende Harnsäureinfusion läßt die Zahl der Zerfälle auf 1319 CPM ansteigen; 5 min nach Ende dieser Infusion werden noch 981 CPM gemessen. Der Leerwert (Grundrauschen), gemessen an Perfusat, das die Leber nicht passiert hat, beträgt 355 CPM. Bei einer Dekanoatzufuhr von 292 nmol/min/g Leber Frischgewicht und einer Harnsäureaufnahme von 238 nmol/min/g Leber Frischgewicht berechnet sich die H_2O_2-Produktion wie folgt:
Dekanoat läßt die Zahl der radioaktiven Zerfälle um 99 CPM ansteigen (Ausgangswerte vor und nach der Infusion gemittelt), die Umsetzung von 238 nmol/min/g Leber Frischgewicht ergibt eine Differenz von 348 CPM; die Infusion von 292 nmol/min/g Leber Frischgewicht erzeugt demnach

$$\frac{99 \text{ CPM} \times 238 \text{ nmol/min/g}}{348 \text{ CPM}} = 68 \text{ nmol/min/g Leber}$$

an H_2O_2. Aufgrund der Eigenschaften des Indikatorsystems wird nur H_2O_2, das auch die Katalase erreicht, umgesetzt. Basierend auf der stöchiometrischen Bildung bei der Uratoxidation (25) und der Lokalisation der Katalase in der Peroxisomenmatrix kann darauf geschlossen werden, daß die gemessene H_2O_2-Bildung Ausdruck peroxisomaler β-Oxidation ist.

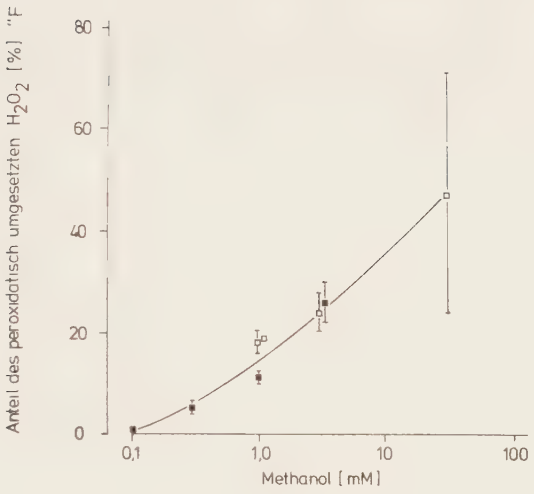

Abb. 6 a: Zunahme des Anteils "F" des peroxidatisch umgesetzten H_2O_2 bei Erhöhung der Konzentration des Wasserstoffdonators Methanol; die H_2O_2-Bildung aus Harnsäure wurde jeweils konstant gehalten. Die geringe Streuung von "F" bei einer Methanolkonzentration von 1 mM war ausschlaggebend für die Benutzung dieser Konzentration in den Perfusionsexperimenten.

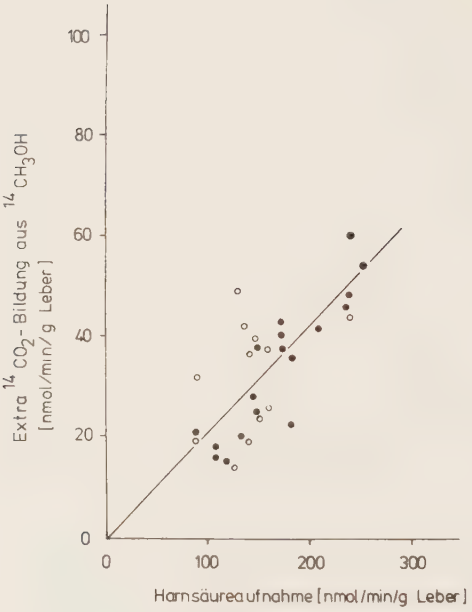

Abb. 6 b: $^{14}CO_2$-Bildung aus $^{14}CH_3OH$ in Abhängigkeit von der Harnsäureaufnahme; die Methanolkonzentration im Perfusat betrug 1 mM. Jeder Punkt zeigt ein einzelnes Perfusionsexperiment. Die Messung der $^{14}CO_2$-Produktion wurde nach Einstellung einer konstanten Harnsäureaufnahme durch die Rattenleber durchgeführt. • Kontrollgruppe, o Bezafibratgruppe.

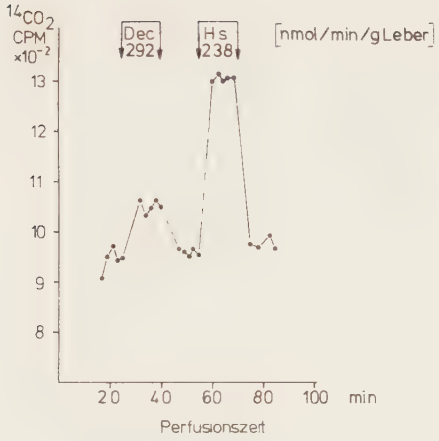

Abb. 6 c: Ergebnisse der $^{14}CO_2$-Messung bei einem typischen Perfusionsexperiment mit Dekanoat und Kalibrierung des Meßsystems mit Harnsäure; die Methanolkonzentration betrug 1 mM. Zur Berechnung der H_2O_2-Bildung aus Dekanoat siehe S. 20.

3. H_2O_2-Produktion verschiedener Fettsäuren

Die Abbildungen 7 a-f zeigen die H_2O_2-Bildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Infusionsgeschwindigkeit bei Oktansäure, Dekansäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Erucasäure und Linolsäure jeweils bei Normal- und Bezafibrat-vorbehandelten Tieren. Es zeigt sich - bis auf die Ölsäureinfusion - bei allen Tieren der H_2O_2-Produktion bei Vorbehandlung der Tiere mit Bezafibrat; bei Ölsäure ist die H_2O_2-Bildung dagegen vermindert. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse bezogen auf eine Infusionsgeschwindigkeit von ca. 300 nmol/min pro g Leber Frischgewicht zusammen.
Die Ergebnisse wurden mit der schon beschriebenen ^{14}C-Methanol-Indikatormethode gewonnen und stimmen mit den Ergebnissen der organspektrophotometrischen Meßmethode überein.

Abb. 7 a-f: H_2O_2-Produktion in Abhängigkeit von der Infusionsrate bei sechs verschiedenen Fettsäuren; ● entspricht Versuchen mit Kontrolltieren, o solchen mit Bezafibrat-vorbehandelten Tieren.

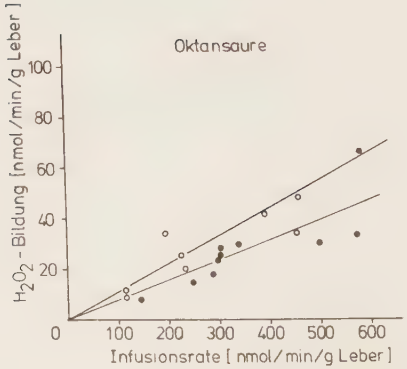

Abb. 7 a

Fortsetzung Abb. 7

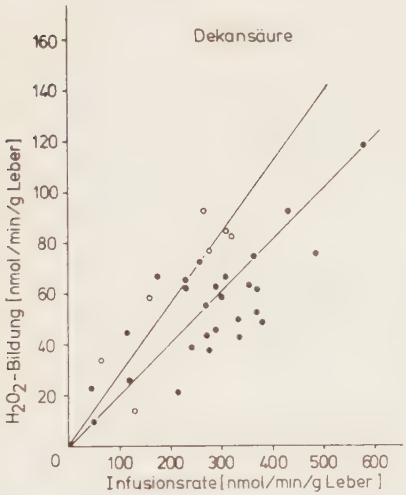

Abb. 7 b

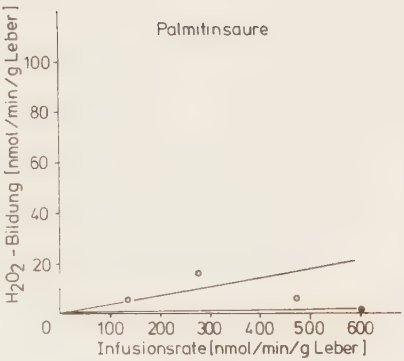

Abb. 7 c

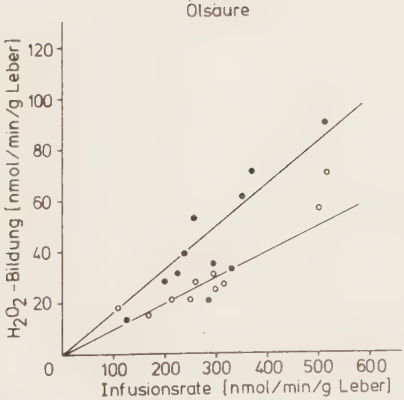

Abb. 7 d

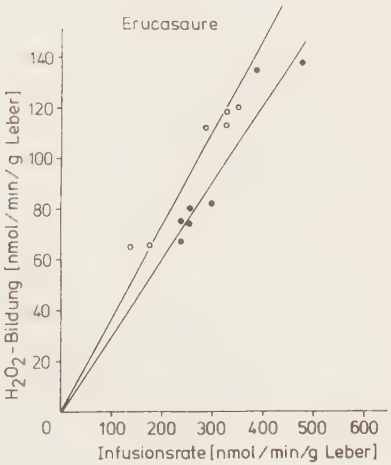

Abb. 7 e

Fortsetzung Abb. 7

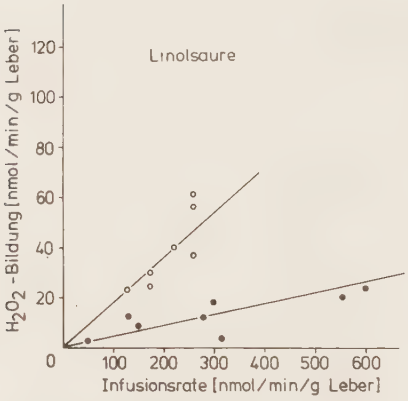

Abb. 7 f

Tabelle 2: H_2O_2-Bildung aus infundierten Fettsäuren in der perfundierten Rattenleber

Fettsäure	Infusionsrate nmol/min/ g	H_2O_2-Bildung nmol/min/ g	peroxisomal (H_2O_2)
Kontrollgruppe			
Oktansäure	309 ± 59 (6)	20 ± 4 (6)	0,06
Dekansäure	342 ± 19 (5)	61 ± 5 (5)	0,18
Palmitins.	280 (2)	-------	----
Ölsäure	326 ± 36 (4)	62 ± 5 (4)	0,19
Erucasäure	297 ± 34 (4)	91 ± 15 (4)	0,31
Linolsäure	294 ± 8 (3)	13 ± 3 (3)	0,04
Bezafibratgruppe			
Oktansäure	300 ± 52 (5)	34 ± 5 (5)	0,11
Dekansäure	290 ± 12 (4)	85 ± 3 (4)	0,29
Palmitins.	293 ± 97 (3)	9 ± 3 (3)	0,03
Ölsäure	302 ± 17 (4)	28 ± 2 (4)	0,09
Erucasäure	288 ± 39 (4)	103 ± 13 (4)	0,36
Linolsäure	260 ± 2 (3)	51 ± 7 (3)	0,20

In der vorliegenden Tabelle wurden Experimente nach Art der in Abb. 6 c (S. 23) gezeigten zusammengefaßt und die H_2O_2-Bildung bei einer Fettsäureinfusionsgeschwindigkeit von 300 nmol/min/g Leber Frischgewicht berechnet. Der peroxisomal verstoffwechselte Anteil wurde als Quotient aus der Extra-H_2O_2-Bildung und der Fettsäureinfusionsgeschwindigkeit ermittelt; damit erfolgte keine Berücksichtigung der "Schicksals" des Kohlenstoffskeletts der verschiedenen Fettsäuren. Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Über die Bezafibratvorbehandlung siehe S. 29.

Neben den hier aufgeführten Fettsäuren wurden auch Buttersäure (4:0), Hexansäure und Heptansäure für Perfusionsexperimente verwendet (ohne Abbildung), bei denen keine signifikante H_2O_2-Bildung festzustellen war.
In Experimenten mit Laurinsäure und Myristinsäure wie auch in einem Experiment mit Arachidonsäure wurde z. T. eine deutliche H_2O_2-Bildung gefunden.

4. Spezifität der Messungen

Abb. 8 zeigt eine Messung des Katalase-Komplexes I bei Vorbehandlung des Versuchstieres mit 3-Amino-1,2,4-triazol, welches durch Alkylierung eines Histidinrestes der Katalase den H_2O_2-Stoffwechsel blockiert (19). Bei erhaltener Stoffwechselaktivität anderer Zellkompartimente, die durch entsprechenden Sauerstoffverbrauch bei Infusion von Urat bzw. Dekanoat gekennzeichnet ist, fehlt der sonst zu beobachtende Anstieg des Δ A (660-640) nm des Katalase-Komplexes I. Bei vergleichbaren Experimenten mit der Methanol-Indikatormethode war ebenfalls kein Anstieg der $^{14}CO_2$-Bildung zu beobachten, so daß die Spezifität der Messungen bewiesen sein dürfte.

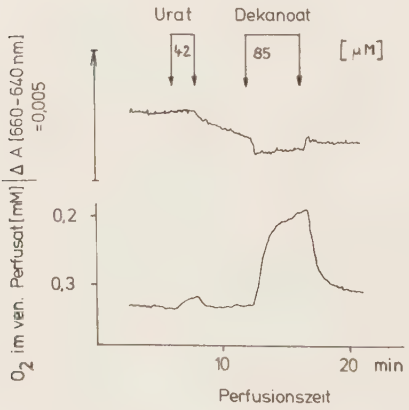

Abb. 8: Wirkung einer Vorbehandlung des Versuchstieres

mit 3-Amino-1,2,4-triazol auf den Katalase-Komplex I; es fehlt eine signifikante Änderung des ΔA (660-640) nm. Die Vorbehandlung erfolgte 1 Stunde vor dem Versuch mit 1 g 3-Amino-1,2,4-triazol/ kg Körpergewicht durch intraperitoneale Injektion einer 50 %igen Lösung (g/v), als Lösungsmittel diente Perfusionsmedium.

5. Bezafibrateffekte auf die Rattenleber

Bezafibrat führt, wie Clofibrat, zur Induktion von Peroxisomen und dabei zur Erhöhung der Kapazität der peroxisomalen β-Oxidation. Lazarow (35) zeigte, daß die Vorbehandlung mit Bezafibrat wahrscheinlich selektiver die peroxisomale Fettsäureoxidation steigert als Clofibrat, weil die Aktivitäten von Katalase und Uratoxidase weitgehend unverändert blieben. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, führt die dreitägige Behandlung mit Bezafibrat (50 mg/kg Körpergewicht i.p., Lösungsmittel: Dimethylsulfoxid) zu einer Mehrbildung von H_2O_2 aus zugeführten Fettsäuren; überraschenderweise ist jedoch bei Ölsäure keine Steigerung, sondern eine Verminderung der H_2O_2-Bildung zu beobachten. Dies ist bemerkenswert, weil bekannt ist (36), daß durch Behandlung mit einem Lipidsenker, in diesem Falle Clofibrat, die Oxidation von ^{14}C-markierter Ölsäure zunimmt.
In der zitierten Arbeit waren aber peroxisomale und mitochondriale β-Oxidation nicht unterschieden worden, so daß die vermehrte Ölsäureoxidation möglicherweise durch eine gesteigerte mitochondriale Umsetzung erklärt werden kann.
Neben der Beeinflussung der peroxisomalen Fettsäureoxidation steigert Bezafibrat in der angegebenen Dosierung das durchschnittliche Lebergewicht um ca. 20 % (siehe Tab. 3).
Die Bezafibratvorbehandlung scheint überdies einen hemmenden Effekt auf die Fettsäureaufnahme der perfundierten Rattenleber auszuüben (siehe S. 30).
Bei mehreren Tieren wurde nach der Vorbehandlung eine fibrinöse Peritonitis mit Verklebungen beobachtet,

die bei bloßer Injektion des Lösungsmittels (Dimethylsulfoxid, 1 ml/kg Körpergewicht i.p.) nicht auftrat.

Lebergewicht (g Leber/100 g Ratte)	
Kontrollgruppe	Bezafibratgruppe
3,94 g ± 0,07 g (40)	4,75 g ± 0,09 g (25)

Tab. 3: Steigerung des durchschnittlichen Lebergewichtes durch eine dreitägige Vorbehandlung der Versuchstiere mit Bezafibrat (50 mg/kg Körpergewicht i.p.; die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

6. Fettsäureaufnahme der perfundierten Rattenleber

Die Fettsäureaufnahme der perfundierten Rattenlebern wurde bei Infusionen von Dekanoat, Palmitat, Oleat und Linolat gemessen (vergl. S. 11). In der Bezafibratgruppe war die Fettsäureaufnahme überraschenderweise erniedrigt.

	Kontrolle	Bezafibrat
Fettsäure	% Aufnahme (n)	% Aufnahme (n)
Oktanoat	ø	ø
Dekanoat	90,4 ± 1,2 (5)	96,2 (1)
Palmitat	67,9 ± 5,8 (5)	55,1 ± 1,5 (3)
Oleat	81,5 ± 2,7 (8)	67,0 ± 3,4 (3)
Erucat	ø	ø
Linolat	89,5 ± 0,9 (2)	81,7 ± 4,3 (2)

Tab. 4: Fettsäureaufnahme der perfundierten Rattenleber; bei Oktanoat und Erucat wurde keine Messung durchgeführt. Die Steigerung der Fettsäureaufnahme bei Dekanoat und Linolat sind nicht signifikant.

7. Ketonkörperproduktion bei Infusion von Fettsäuren

Mannaerts et al. (12) geben als Charakteristikum der peroxisomalen β-Oxidation das Fehlen der Ketonkörperbildung an, wie sie bei der mitochondrialen β-Oxidation zu beobachten ist.
Zur Abschätzung des mitochondrial verstoffwechselten Anteils der infundierten Fettsäuren wurden deshalb im ausfließenden Perfusat L-Acetoacetat und L-β-Hydroxybutyrat gemessen (27). Vergl. auch S. 10.
Einer 100 %igen mitochondrialen Fettsäureoxidation entspräche bei Infusion von beispielsweise 100 nmol/min/g Leber Oktanoat eine Produktion von 200 nmol/min/g Leber Ketonkörpern (C_4-Einheiten).
Tab. 5 zeigt den durchschnittlich in Form von Ketonkörpern im Perfusat wiedergefundenen Anteil der infundierten Fettsäuren.

Fettsäure	Anteil als Ketonkörper (%)
Oktanoat	88,5
Dekanoat	58,2
Oleat	19,1
Palmitat	16,0
Erucat	10,7
Linolat	nicht gemessen

Tab. 5: Anteil verschiedener infundierter Fettsäuren, der als Ketonkörper (L-Acetoacetat und L-β-Hydroxybutyrat) wiedergefunden wurde; nach (12) entspräche dieser Teil dem mitochondrialen Fettsäureabbau.

IV. Diskussion

1. Messung der H_2O_2-Bildung

Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse der organspektrophotometrischen Messungen der H_2O_2-Bildung mit denen der $^{14}CH_3OH$-Indikatormethode zeigt, daß beide Methoden verläßliche Aussagen liefern. Die Resultate der Versuche mit den beiden organspektrophotometrischen Meßmethoden ermöglichen aufgrund ihrer annähernden Gleichheit eine Stellungnahme zu der in der Literatur noch nicht geklärten Frage des Vorkommens extraperoxisomaler Katalase (vergl. (38)). Die Messung des Katalase-Komplexes I bei Fettsäureinfusion lieferte sowohl bei Kalibrierung durch die Uratoxidation als auch bei der Durchführung einer Methanoltitration fast dieselben Ergebnisse (vergl. Abb. 3, 4, 5 und Tabelle 1).
Während bei der ersteren Kalibrierung wegen der Eigenschaft der Uratoxidase als peroxisomales Markerenzym nur die peroxisomale Katalase erfaßt wird, erfolgt bei der Methanoltitration die Messung des Katalase-Komplexes zusätzlich extraperoxisomal, d.h. in der gesamten Zelle. Daraus kann geschlossen werden, daß in der Rattenleber eventuell extraperoxisomal vorkommende Katalase so gering konzentriert sein dürfte, daß sie bei den vorliegenden Untersuchungen vernachlässigt werden kann.

2. H_2O_2-Bildung aus freien Fettsäuren in der intakt perfundierten Rattenleber und in isolierten Peroxisomen im Vergleich

Der Anteil der H_2O_2-Bildung in Relation zur Fettsäureinfusionsrate ist relativ gering, er beträgt

0,06 mit Oktanoat und 0,09 mit Dekanoat. Überraschenderweise ist bei Palmitinsäureinfusion keine H_2O_2-Bildung zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die peroxisomale β-Oxidation in der intakt perfundierten Rattenleber nur zu einem Teil ihrer Maximalkapazität benutzt wird, wie sie an isolierten Peroxisomen gemessen wurde. -
Zelluläre Mechanismen, die das Verhältnis von peroxisomaler und mitochondrialer β-Oxidation steuern, sind bisher noch nicht bekannt.
Dazu kommt noch das Problem des Transports der Acyl-CoA-Verbindungen (38) in die Peroxisomenmatrix durch das von (39) beschriebene Transportsystem. Dies erklärt aber noch nicht, warum das Standardsubstrat für die Messung der peroxisomalen β-Oxidation, Palmitinsäure (16:0), keine H_2O_2-Bildung im intakten Organ bewirkt (7, 39, 41). Möglicherweise erklärt der Nachweis eines wirksamen Hemmstoffes der Acyl-CoA-Oxidase, 3-Ketohexadekanoyl-CoA (K_i = 0,47 µmol), diese Beobachtung (13). Diese Verbindung entsteht als Intermediat der peroxisomalen β-Oxidation und könnte im intakten Organ stärker kompetitiv als in isolierten Peroxisomen das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dieses Stoffwechselweges hemmen. Kürzerkettige oder längerkettige ungesättigte Fettsäuren könnten geeignetere Substrate sein, da sie im Intermediärstoffwechsel nicht zur Bildung dieses starken Hemmstoffes führen. Außerdem scheint Palmitinsäure bis zu 70 % für die Triglyceridsynthese verwendet zu werden (48), so daß nach Berücksichtigung der mitochondrialen Fettsäureoxidation nur noch ein geringer Teil für die peroxisomale β-Oxidation verbleibt.
Die geringe H_2O_2-Bildung wurde auch von (12) in Versuchen mit isolierten Hepatocyten bestätigt.
Zusammengefaßt sprechen die Ergebnisse dafür, daß

peroxisomal hauptsächlich der erste Zyklus der β-Oxidation abläuft, d.h., nur eine Acetyl-CoA-Einheit freigesetzt wird, wogegen die folgenden Zyklen durch verschiedene akkumulierende Intermediärprodukte, wie 3-Ketoderivate, gehemmt werden. Das System scheint dagegen längerkettige, seltenere, einfach ungesättigte Fettsäuren besser zu oxidieren (39, 41); vermutlich wirken 3-Ketoenol-Acyl-CoA-Ester weniger stark hemmend auf die Acyl-CoA-Oxidase.

Die Gesamtbedeutung der peroxisomalen β-Oxidation scheint damit in Übereinstimmung mit (42, 43, 44, 45) einen geringeren Teil zur gesamten zellulären Fettsäureoxidation bezutragen, als ihr von Lazarow (46) eingeräumt wurde.

Die kurzkettigen Fettsäuren werden zu einem großen Teil in Form von Ketokörpern wiedergefunden, vor allem Oktanoat, das carnitinunabhängig in Rattenlebermitochondrien gelangen kann (12).

Die langkettigen Fettsäuren werden nur zum kleineren Teil zu Ketonkörpern umgesetzt; das bedeutet aber nicht, daß diese nun ausschließlich peroxisomal metabolisiert werden; der überwiegende Teil dieser Fettsäuren dürfte bei der Triglyceridsynthese Verwendung finden.

V. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurde die H_2O_2-Bildung beim Stoffwechsel freier Fettsäuren in der isoliert perfundierten Rattenleber mit zwei verschiedenen Methoden untersucht.

2. Die organspektrophotometrische Messung des Katalase-Komplexes I wurde zur Untersuchung der H_2O_2-Bildung a) nach Kalibrierung des Systems mit der Uratoxidation und b) durch eine Titration mit Wasserstoffdonatoren (Methanol) herangezogen.

3. Unter Benutzung des peroxidatischen Reaktionsweges der Katalase wurde ^{14}C-Methanol als Wasserstoffdonator zugegeben (Methanolkonzentration 1 mM, in Anwesenheit von 0,2 mM L-Methionin) und die $^{14}CO_2$-Bildung gemessen. Die $^{14}CO_2$-Bildung diente als indirektes Maß der H_2O_2-Bildung aus infundierten Fettsäuren.

4. Die Ergebnisse der beiden verwendeten Methoden ergaben eine größenordnungsmäßige Übereinstimmung.

5. Der Anteil der H_2O_2-Bildung, gemessen als Quotient aus H_2O_2-Bildungsgeschwindigkeit und Fettsäureinfusionsgeschwindigkeit, war bei allen Fettsäuren kleiner als 1,0 , was darauf hinweist, daß - unabhängig von der Kettenlänge - wahrscheinlich nur eine Acetyl-CoA-Einheit pro Fettsäuremolekül im Peroxisom gebildet wird.
   Vor allem das Standardsubstrat der peroxisomalen β-Oxidation, Palmitinsäure (16:0), führte am intakt perfundierten Organ zu keiner H_2O_2-Bildung. Einfach ungesättigte, langkettige Fettsäuren erzeugten relativ viel H_2O_2.

6. Der Lipidsenker Bezafibrat erhöhte bis auf eine Ausnahme den Anteil der H_2O_2-Produktion des Fettsäurestoffwechsels. Bei Ölsäure wurde dieser bis zur Hälfte des Ausgangswertes vermindert.

7. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß in der intakt perfundierten Rattenleber die β-Oxidation nur zu einem Teil ihrer Maximalkapazität ausgenutzt wird. Die gemessene H_2O_2-Bildung aus freien Fettsäuren scheint aber zu einem beträchtlichen Teil zur endogenen H_2O_2-Produktion, die am Gesamtorganismus gefunden wurde, beizutragen.

Es wäre sicherlich interessant zu untersuchen, ob die geringe H_2O_2-Produktion unter anderen Stoffwechselbedingungen als in der vorliegenden Arbeit verändert ist und ob man sie auf den Gesamtorganismus übertragen kann.
Oshino et al. (47) stellten mit der organspektrophotometrischen Methode an der intakten Leber der anästhesierten Ratte die Bildung von 0,38 µmol/min pro g Frischgewicht fest. Bei physiologischen Fettsäurekonzentrationen ergäbe die Extrapolation der Ergebnisse aus Tab. 2 eine recht gute Übereinstimmung mit der H_2O_2-Produktion des Gesamtorganismus.

6. Literaturhinweise

1. Singer, T.P. and Edmondson, D.E., (1974), in "Molecular Oxygen In Biology", (O. Hayaishi, ed.), S. 315-337, North-Holland Publishing Co., Amsterdam

2. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Physiol. Rev. 59, S. 527-605

3. Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., (1972) Biochem J.,128, S. 617-630

4. Bartoli, G.M., Galeotti, T., Azzi, A. (1977) Biochem. Biophys. Acta 497, S. 622-626

5. Sies, H. (1974) Angewandte Chemie 86, S. 789-801

6. Cooper, T.G., Beevers, H. (1969), Journal of Biol. Chem. 244, S . 3514-3520

7. Lazarow, P.B., de Duve, C. (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, S. 2043-2046

8. Kawamoto, S., Nozaki, C., Tanaka, A., Fukui, S. (1978), Eur. J. Biochem. 83, S. 609-613

9. Kramar, R., Hüttinger, M., Gmeiner, B., Goldenberg, H. (1978) Biochem.Biophys.Acta 531, S. 353-356

10. Murphy, P.A., Krahling, J. B., Gee, R., Kirk, J.R., Tolbert, N.E. (1979), Arch. Biochem. Biophys. 193, S. 179-185

11. Bronfman, M., Inestrosa, N.C., Leighton, F. (1979), Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, S. 1030-1036

12. Mannaerts, G.P., Debeer, L.J., Thomas, J., de Schepper, P.J., (1979), J. Biol. Chem. 254, S. 4585-4595

13. Osumi, T., Hashimoto, T. Ui, N. (1980) J. Biochem. 87, 1735-1746

14. Fahimi, H.D., Kalmbach, P., Stegmeier, K. , Stork, H., (1979) in"Lipoproteine und Herz-infarkt", (. Greten, P.D. Lang, G. Schettler ed.) Verlag G. Witzstrock, Baden-Baden, Köln, New York

15. Chance, B. (1947) Acta Chem. Scand. 1, S. 236

16. Thenard, L.J., l'Academie de Sciences, Paris 1818 u. Thenard, L.J., Traité de Chimie, 6. Auflage Bd. I ed. Crochard, Paris 1834, S. 529

17. Keilin, D., Hartree, E.F. (1936) Proc. Roy. Soc. B. 119, S. 141

18. Keilin, D., Hartree, E.F. (1945) Biochem. J. 39, S. 293

19. Sies, H., Chance, B. (1970) FEBS Letters 11, S.172-176

20. Sies, H. (1971) Fed. Proc. 30 S. 1132 A

21. Sies, H. (1978) Meth. Enzymol. 52, S. 48-59

22. Bücher, T., Brauser, B., Conze, A. Klein, F., Langguth O., Sies, H. (1972) Eur. J. Biochem. 27, 301-317

23. Krebs, H.A., Henseleit, K. (1932), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, S. 33-66

24. Oshino, N., Chance, B., Sies, H., Bücher, T., (1973), Arch. Biochem Biophys. 154, S. 117-131

25. Oshino, N., Jamieson, D., Chance, B., (1975), Biochem. J. 146, S. 53-65

26. Sies, H., Gerstenecker, C., Summer, K.H., Menzel, H., Flohé, L. (1973) in "Glutathione" (Flohé, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A., eds.), S. 261-275 Thieme-Verlag, Stuttgart

27. Bergmeyer, H.U., ed. (1974), Methoden der Enzymatischen Analyse, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim

28. Duncombe, W.G.,(1964) Clin. Chim. Acta 9, S. 122-129

29. Laurell, S., Tibbling, G. (1976) Clin. Chim. Acta 16, S. 57-62

30. Schwab, H., Sies, H. (1978), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, S. 385-392

31. Häussinger, D., Weiss, L., Sies, H. (1975), Eur. J. Biochem. 52, S. 421-431

32. Sies, H. (1977) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, S. 1021-1032

33. Oshino, N., Oshino, R., Chance, B. (1973), Biochem. J. 131, S. 555-563

34. May, J.M., de Haen, C. (1979) J. Biol. Chem. 254, S.2214-2220

35. Lazarow, P.B., (1979), in "Lipoproteine und Herzinfarkt" (Greten, H., Lang, P.D., Schettler, G. eds), S. 100-104; Witzstrock Verlag, Baden-Baden, Köln, New York

36. Laker, M.E., Mayes, P.A. (1979)
Biochem. Pharmacol. 28, S. 2813-2827

37. Masters, C., Holmes, R. (1977)
Physiol. Rev. 57, S. 816-882

38. Osmundsen, H.,Neat, C.E. (1979)
FEBS-Lett. 107, S. 81-85

39. Appelkvist, E.L., Dallner, G.(1980),
Biochem. Biophys. Acta, 617, S. 156-160

40. Osmundsen, H., Neat, C.E., Norum, K.R. (1979)
FEBS-Lett. 99, S. 292-296

41. Inestrosa, N.C., Bronfman, M.,Leighton, F. (1979)
Life Sci. 25, S. 1127-1135

42. Inestrosa, N.C., Bronfman, M., Leighton, F. (1979)
Biochem.J. 182, S. 779-788

43. Krahling, J.B., Gee, R., Murphy, P.A., Kirk, J.P., Tolbert, N.E. (1978),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, S. 136-141

44. Shindo, Y., Hashimoto, T. (1978)
J. Biochem. (Tokyo) 84, S. 1177-1181

45. Hryb, D.J., Hogg, J.F. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, S. 1200-1206

46. Lazarow, P.B. (1978)
J. Biol. Chem. 253, S. 1522-1528

47. Oshino, N. Jamieson, D., Sugano, T. Chance, B. (1975)
Biochem. J. 146, S. 67-77

48. Kondrup, J., (1979)
Biochem J. 184, S. 63-71

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Helmut Sies, danke ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas, für die Unterstützung und die zahlreichen Ratschläge bei den Versuchen und bei der Abfassung dieser Arbeit.
Herrn Dr. rer. nat. Ernst Foerster, Frau Ursula Rabe und Herrn Peter Graf danke ich für die gute Zusammenarbeit bei Messungen und die freundliche Atmosphäre im Labor.

Lebenslauf

Geboren am 14. Februar 1959 in Dortmund als Sohn des Elektroobersteigers Wilhelm Fährenkemper und seiner Ehefrau Inge, geb. Ledmade.

Besuch der Volksschule in Dortmund-Huckarde von 1965-1968, anschließend Besuch des Adalbert-Stifter-Gymnasiums in Castrop-Rauxel. Dort Ablegung der Reifeprüfung im Jahre 1977.

Beginn des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf im Wintersemester 1977/78.

Ablegung der Ärztlichen Vorprüfung nach dem Sommersemester 1979.

Im März 1980 Beginn der Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation bei Herrn Prof. Dr. med. H. Sies am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf.

Während der Untersuchungen Ablegung des 1. Teils der Ärztlichen Prüfung nach dem Sommersemester 1980.

Ablegung des 2. Teils der Ärztlichen Prüfung nach dem Sommersemester 1982.

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606